

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6: C12Q 1/68	A1	(11) International Publication Number: WO 97/19191 (43) International Publication Date: 29 May 1997 (29.05.97)
(21) International Application Number: PCT/NO96/00271 (22) International Filing Date: 15 November 1996 (15.11.96) (30) Priority Data: 954667 17 November 1995 (17.11.95) NO (71)(72) Applicants and Inventors: ØGREID, Dagfinn (NO/NO), Søkkedalstia 26, N-5062 Benes (NO); ULVIK, Arve (NO/NO); Fabrikkt. 12, N-5037 Solheimsvik (NO); KOORNSTRA, Jan, Jacob (NL/NL); Tjijhoffburg 20, NL-7511 LM Enschede (NL). (74) Agent: ONSAGERS PATENTKONTOR A/S; P.O. Box 265 Sentrum, N-0103 Oslo (NO).		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i>
(54) Title: METHOD FOR DETECTION OF KI-RAS MUTATIONS AND KIT TO PERFORM IT (57) Abstract Method for detecting Ki-ras mutations in exon I, codon 12 to 13 in samples of tissue, tumor tissue, tissue secretions, excretions, expectorates, blood and lymph by two subsequent PCR amplifications comprising a regular PCR amplification and an allele specific amplification and wherein the identification step may comprise a Phast Gel SSCP, characterized in that by a specific selection of oligoprimers in the combination of two PCR amplifications and the Phast Gel identification or in the combination of the said regular PCR amplification and Phast Gel identification produced direct detection of the mutations is produced.		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2000-500346
(P2000-500346A)

(43) 公表日 平成12年1月18日 (2000.1.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
// C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁)

(21) 出願番号 特願平9-519622
(86) (22) 出願日 平成8年11月15日 (1996.11.15)
(85) 翻訳文提出日 平成10年5月18日 (1998.5.18)
(86) 国際出願番号 P C T / N O 9 6 / 0 0 2 7 1
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 1 9 1 9 1
(87) 国際公開日 平成9年5月29日 (1997.5.29)
(31) 優先権主張番号 9 5 4 6 6 7
(32) 優先日 平成7年11月17日 (1995.11.17)
(33) 優先権主張国 ノールウェー (NO)

(71) 出願人 オグレイド ダグフィン
ノールウェー国 エヌ-5062 ベネス ス
トッケダルスリア 26
(71) 出願人 ウルヴィク アルネ
ノールウェー国 エヌ-5037 ソルヘイム
スヴィク ファブリックグト 12
(71) 出願人 クールンストラ ヤン ヤコブ
オランダ国 エヌエル-7511 エルエム
エンスヘデ ティイホフブルグ 20
(72) 発明者 オグレイド ダグフィン
ノールウェー国 エヌ-5062 ベネス ス
トッケダルスリア 26
(74) 代理人 弁理士 北村 欣一 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K i - r a s 突然変異の検出方法および該検出方法を実施するためのキット

(57) 【要約】

2つの連続するPCR増幅により、組織、腫瘍組織、組織分泌物、排泄物、喀出物、血液およびリンパ液のサンプル中の、エキソン1中の、コドン12~13のK i - r a s突然変異を検出する方法であって、正規のPCR増幅と対立遺伝子特異的増幅とを含み、該同定段階が、ファーストゲルSSCPを含む検出方法において、該2つのPCR増幅と該ファーストゲル同定との組み合わせ、または該正規のPCR増幅とファーストゲル同定との組み合わせにおける、生成されたオリゴプライマーの特異的選択によって、該突然変異の直接的検出がもたらされることを特徴とする、上記K i - r a s突然変異の検出方法。

【特許請求の範囲】

1. 2つの連続するPCR増幅により、組織、腫瘍組織、組織分泌物、排泄物、喀出物、血液およびリンパ液のサンプル中の、エキソン1中の、コドン12~13のKi-ras突然変異を検出する方法であって、正規のPCR増幅と対立遺伝子特異的増幅とを含み、該同定段階が、ファーストゲルSSCPを含む検出方法において、該2つのPCR増幅と該ファーストゲル同定との組み合わせ、または該正規のPCR増幅とファーストゲル同定との組み合わせにおける、生成されたオリゴプライマーの特異的選択によって、該突然変異の直接的検出がもたらされることを特徴とする、上記Ki-ras突然変異の検出方法。

2. DNAを精製し、かつ分離した後、該突然変異に対する特異的フランキングオリゴプライマーを使用し、該DNAの5'末端における付随的な特異的オリゴヌクレオチドと共に、上記のフランキングオリゴプライマーの使用を組み合わせまたは組み合わせずに(半入れ子式PCR)、少なくとも2つのミスマッチをもつプローブを使用する第三の段階と組み合わせまたは組み合わせずに、該突然変異を含む特異的PCR生成物を生成し、かつ適当な方法によって該突然変異体を同定する、請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 該サンプルを結腸、直腸、肺、膵臓、甲状腺および前立腺から採取する、請求の範囲第1~2項に記載の方法。

4. 該方法で使用する該サンプルが、新鮮なおよび/または凍結されたおよび/またはパラフィンに包埋されたものである、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

5. 該サンプルが、血液、リンパ液、分泌物、排泄物、喀出物中に堆積した細胞を表す、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

6. 該サンプルが、大便、唾液、膵臓由来の囊胞性流体、結腸および直腸由来の生検検体を含む、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

7. 該第三段階における該ミスマッチプローブが、3'末端に少なくとも一つのミスマッチを、および該3'末端から2または3塩基の位置に一つの付随的なミスマ

ッチを有する、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

8. 該生成された特異的PCR 生成物が221 塩基対を有する、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。
9. 該特異的オリゴプライマーを、Ki-ras中のエキソン1の各フランキング領域における、15-28 塩基とハイブリッド化する、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。
10. 段階1の上流側および下流側フランキングオリゴプライマーが、それぞれ5'-AAG CCT ATG TGT GAC ATG TTC TAA T-3'(R1)(Seq. id. no.5)および5'-AAT GGT CCT GCA CCA GTA AT-3'(R2)(Seq. id. no.2)である、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。
11. 段階2の付随的なオリゴプライマーが5'-GGT GGA GTA TTA ACC TTA TGT-3'(R3)(Seq. id. no. 11)上流であり、一方で請求の範囲第11項に記載のR2(Seq. id. no.2)を、該下流側オリゴプライマーとして使用した、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。
12. 該段階3の突然変異特異的ミスマッチプライマーが、GCT:5'-AAG GCA CTC T TG CCT ACG CTA G-3'(R4)(Seq. id. no. 11); GTT:5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA A-3'(R5)(Seq. id. no.6); GAT:5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA T-3'(R6)(Seq. id. no.7); GAC:5'-CGT CAA GGC ACT CCT GCC TAC CT-3'(R7)(Seq. id. no.8); AGT:5'-ACG CAC TCT TGC CTA CGC TAT T-3'(R8)(Seq. id. no.9); TGT: 5'-GCA CTC TTG CCT ACG CCA TA-3'(R9)(Seq. id. no.10)である、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。
13. 該同定段階を、適当なゲルを使用して実施する、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。
14. 該同定段階を、予備注型ポリアクリルアミドミニゲル(ファーストゲル)上で実施する、請求の範囲第14項に記載の方法。
15. 該方法で出発物質として使用する大便の量が、5-100 mg、好ましくは10mgである、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。
16. 該方法で出発物質として使用する腫瘍組織の量が、2-50mg、好ましくは25mgである、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

17. 請求の範囲第1項に記載の方法を実施するためのキットであって、該キットが該PCR 反応を実施するための化学物質、オリゴプライマー、適当なゲルおよび該PCR 生成物を分析するための検出系を含むことを特徴とする、上記キット。

【発明の詳細な説明】

Ki-ras突然変異の検出方法および該検出方法を実施するためのキット

本発明は、特定のオリゴプライマーを使用したPCR増幅による、組織および大便のサンプル中の突然変異を検出する方法およびこの方法を実施するためのキットに関するものである。

一群の増大しつつある証拠は、ヒトの癌の誘発における、その原因上重要なものとして、体細胞突然変異が関与しているとしている。これらの体細胞突然変異は、以前正常であったゲノム内に蓄積され、従ってその幾つかが悪性成長と関連する表現型であることを明らかにすることができる。このような発癌性突然変異は、欠失、転座および単一ヌクレオチド改変を包含する、DNA構造における、多数の種々の型の改変を含む可能性がある。点突然変異としても知られる後者は、種々の突然変異誘発性化学試薬がこのような突然変異を誘発するという意味で、しばしば発癌に関与する。更に、このような突然変異はDNAの複製における誤りの結果として自然に発生する可能性もある。

組み換えDNA技術の進歩は、成長、発生、および分化を制御する正常な細胞遺伝子（プロトオンコジーンおよび腫瘍抑制遺伝子）の発見に導いた。幾つかの状況の下で、これら遺伝子の調節が変更され、かつこれらが、正常な細胞に悪性成長挙動をとらしめる。これまでに、100個を超えるプロトオンコジーンおよび抑制遺伝子が知られており、これらはその機能的特徴に依存して様々なカテゴリーに入る。該カテゴリーは、(1)成長因子および成長因子レセプター、(2)例えば細胞質と核との間の、細胞内シグナル伝達経路のメッセンジャー、および(3)遺伝子発現およびDNAの複製に影響を与える調節タンパクを包含する。

点突然変異は、多くのヒトにおける腫瘍の因果関係に直接関与している。幾つかの腫瘍は、ras遺伝子群の癌遺伝子をもち、これらは、該遺伝子中の限られた数のサイトの一つにおける点突然変異の存在によって、その正常な細胞のかたわれのプロトオンコジーンとは異なっている。同様に、腫瘍抑制遺伝子、例えばp53の決定的な領域における点突然変異が、しばしば腫瘍細胞中に検出さ

れる。これらの突然変異は、該腫瘍細胞ゲノムにおける定性的な変化を示し、該細胞ゲノムは、これら細胞を正常な細胞から識別し、かつ研究中の腫瘍の遺伝的起源の診断の基礎を与える。活性な癌遺伝子を生成している突然変異の同定は、腫瘍発現に関する診断並びに予後上の重要な手掛かりを与える可能性がある。例えば、多数の突然変異が、通常存在するグリシンの、幾つかの別のアミノ酸残基の何れかへの置換を生ずる、該 *ras* 癌遺伝子の第12番目のコドンを変更することが見出されている。このようなアミノ酸置換は、有力な形質転換する対立遺伝子を生成する。従って、特別なヌクレオチド置換の存在は、腫瘍細胞の挙動（例えば、その成長速度、伝播等）の強力な決定因子である可能性がある。結果として、癌遺伝子突然変異のDNAプローブは臨床的腫瘍学における診断薬として有望である。

種々の型の新生物の中の、胃腸管内に見出されているその幾つかは、該遺伝子突然変異と関連している。この関連性は、特に膵臓癌および結腸直腸癌に関して特に重要である。結腸直腸癌は世界で第三位の最も一般的な悪性癌であり、1996年には700,000人を越える新たな患者が予想される。米国だけでも、70,000人を越える人々が同じ年に結腸直腸癌により死亡するであろう。進行性疾患に罹った患者は極めて貧弱な予後状況にあるが、転移前の任意の段階において診断された結腸直腸腫瘍は、通常外科的なまたは結腸内視鏡術による切除によって治療し得る。外科的に切除可能な腫瘍を検出するための方法は、従ってこの疾患による死亡率を大幅に減ずる（ウイナウア(Winawer)等, J. National Cancer Institute, 1991, 83:243)。

哺乳動物核酸の大便中での検出法は、W093/20235（ボーゲルシュタイン(Vogelstein, B. & キンツラー(Kinzler), K.) により公知である。この方法は、糞の精製および変異誘発された *ras* 遺伝子の増幅に関する、異なる2種の方法を含む。方法1はKi-rasのPCR増幅およびこれに引き続き行われる該増幅されたKi-rasの、バクテリアファージへのクローニング、該ファージの培養、およびKi-rasにおける単一突然変異に対して特異的である、オリゴヌクレオチドプローブとのブランクのハイブリッド化に基づく。方法2は、PCR増幅、癌PCR生成物のゲル電気泳動、該生成物のナイロン線維へのハイブリダイゼーション、および各突然変異に

対して特異的な、放射性同位元素で標識したプローブとの、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションに基づく。これら両者の方法は、高感度および特異的である。不幸にも、これらの方法は、Ki-rasにおけるあらゆる突然変異が、一つの方法によって検出されないことから、両者共に時間を要し、また多大な労力を要する。エキソン I におけるKi-rasの10個を越える突然変異が、すでに記載されている。上記の方法は、これら突然変異各々に対して特異的な遺伝子プローブを使用している。大便のサンプルがスクリーニングされ、先験的に突然変異の存在が未知である場合には、各サンプルに対して、極めて多数の異なるプローブを使用する必要がある、また更に各プローブを同位体により標識する必要がある。

大便由来のDNAのPCR増幅も、スミスーラビン(Smith-Ravin)等(Gut, 1995, 3 5, pp.81-86)により公知である。この手順では、10-50gの大便を使用し、かつDNAを抽出し、次いで精製されたDNAを、ミトコンドリアプライマーを使用して増幅し、対立遺伝子特異的ミスマッチ法を利用してras突然変異について解析した。全検出率は22のうち9であり、この方法は大量の大便を使用し、かつスクリーニングには不適當であった。というのは、特定のMASAプローブを、該突然変異の検出のために使用する必要があったからである。

ハセガワ(Hasegawa)等は、文献Oncogene, 1995, 10, pp.1441-45において、19名中15名の患者由来のDNAを、標準的なMASA技術を利用して増幅し、3種の突然変異を同定した。これに従って、特定のMASA技術を実施し、結果として10名の患者中に突然変異が検出された。この手順に関わる問題は、低い検出率および各突然変異に対して特異的プローブを使用する必要がある点にある。従って、この方法はスクリーニング分析には不適當である。

本発明の目的は、十分な特異性と、実施の簡略さとをもち、少量の基質を使用した、組織および大便中のKi-ras突然変異の検出用のスクリーニング手順を提供することにある。

これらの目的は、本明細書に添付された請求の範囲によって特徴付けられる本発明によって達成される。

本発明は、組織または大便の少量サンプル中の、Ki-ras突然変異を検出するためのスクリーニング手順に関連し、該手順においては、本発明による特異的なプ

ライマーを使用して、221塩基対をもつPCR生成物を生成する。この生成物は、固有のSSCPパターンを示す。該パターンにおいては、各突然変異を、ファーストゲル(Phast-gels) (ファルマーシア(Pharmacia)社) 上で実施したSSCP解析を利用して、検出し、かつ同定する。

該PCR生成物の量を増大するために、引き続き半一入れ子式(semi-nested)PCRを実施することができ、該PCR法では、5'末端において余分のオリゴヌクレオチドを使用し、一方で3'末端で、該第一段階の特異的なオリゴプライマーを使用した。次のPCRサイクルにおいて、該第一段階からの両オリゴプライマーを使用した。結果として、該221塩基対をもつPCR生成物を得た。この生成物において、該突然変異はファーストゲルSSCPを使用して、上記のように検出した。

本発明による、感度における更なる増加は、第三段階において、対立遺伝子特異的増幅または突然変異特異的プライマー伸長を利用することによって達成される。この段階は、該3'末端における最後の塩基上に、野性型遺伝子に対する一つのミスマッチおよび該3'末端から第二または第三番目の塩基上に付随的なミスマッチを含むプローブの使用を含む。この方法は、驚いたことに該方法の感度を高めた。かくして、本発明の方法を利用することにより、Ki-ras突然変異を、二重PCRを使用して、12名中8名の患者に検出し、別の研究では、7名の患者中に、Ki-rasに突然変異をもつ6名の患者が、該第一段階で検出され、一方で突然変異をもつ該7名の患者は、段階1および2の組み合わせにより検出された。このようにして、検出率は単一PCRについて90%であり、また組み合わせPCRでは100%であった。

以下、実施例および添付図を参照しつつ、本発明を詳細に説明する。

第1図は、Ki-rasエキソン1のSSCP解析を示す。レーン1:野性型(コドン12および13の該野性型の配列は、それぞれGGTおよびGGCである)。レーン2-7:野性型および該コドン12の突然変異に対して異型接合のサンプル: 2: AGT、3: CGT、4: TGT、5: GAT、6: GCTおよび7: GTT。レーン8:野性型に対して異型接合のサンプルおよびコドン13突然変異 GAC。レーン9:野性型に対して異型接合のサンプルおよびコドン12の稀な二重突然変異:TTT。

第2図は、外科的検体由来の該Ki-ras遺伝子のエキソンIのPCR-SSCP解析を示

す図である。レーン1におけるサンプルを除き、全てのサンプルは異型接合である。野性型のコドン12は GGT、およびコドン13は GGCである。電気泳動を均一なファーストゲル20上で行った。

コドン12突然変異は、以下のレーンに示されている。レーン1: AGT (野性型の対立遺伝子は失われている)、レーン2: CGT、レーン3: TGT、レーン4: GAT、レーン5: GCT、レーン6: GTT、レーン8: TTT。レーン7はコドン13の突然変異:GACを示している。

第3図は、該腫瘍中に見出される異なる突然変異の頻度を示す。

第4図は、患者C-05由来の腺腫1の配列解析を示す。Ki-ras由来のエキソン1の配列解析は、コドン12における2つのGからTへの転移(矢印)を示す。

第5図は、糞から精製されたDNAのASA解析(識別PCR)からのPCR生成物のゲル電気泳動を示す図である。シグナルは正のGTT突然変異を示す。1および2:患者C04、3および4:患者C-23、5および6:正のコントロール、7: 1:100に希釈した正のコントロール、8および9:負のコントロール(テスト中の突然変異以外のもう一つの突然変異をもつ患者由来の糞)、12: 負のコントロール(DNAを添加せず)。

本発明は、大便中に存在する変異体ヌクレオチド配列を有する核酸を検出するための方法に関し、該方法において、変更された核酸配列の存在は、胃腸管の腫瘍形成と関連している。

最も広い意味において、本発明は、診断または治療に関連のある任意のターゲット核酸配列の検出を可能とし、ここで該ターゲット核酸配列は大便中に存在する。従って、このターゲットヌクレオチド配列は、例えば変異体ヌクレオチド、制限フラグメント長さ多形(RFLP)、ヌクレオチド欠失、ヌクレオチド置換、または興味の対象となる任意の他の哺乳動物の核酸配列であり得る。

一態様において、本発明の方法は、良性および悪性腫瘍形成と関連する、変異体ヌクレオチド配列の検出に適用できる。好ましい態様において、小腸および大腸の両方、膵臓および胃を包含する胃腸管の腫瘍形成は、その起源によらず、その配列が大便中に検出可能状態で存在する限りにおいて検出される。但し、本発明の方法は任意の腫瘍形成性変異体ヌクレオチド配列を検出するのに利用できる

。小腸の良性腫瘍形成は腺腫、平滑筋腫、脂肪腫、および血管腫を包含し、一方で大腸良性腫瘍形成は、主として腺腫様ポリープである。小腸の悪性腫瘍形成は腺癌、平滑筋肉腫、リンパ腫、および癌腫を包含する。大腸および結腸の場合、結腸直腸癌が、同定された最も一般的な悪性腫瘍形成である。

異常な遺伝子生成物を生成する変異体ヌクレオチド配列をもつ多数の核酸が、種々の腫瘍形成に関連していることが知られている。最も一般的な変異体ヌクレオチド配列としては、癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子、例えばMCC、DCC、APC、FAP、p53、および種々のDNA修復酵素がある。本発明において特に重要なのは、該Ki-ras突然変異癌遺伝子の検出である。

本発明の方法に従って大便検体を分析するためには、該検体内に存在する哺乳動物の核酸を分離することが必要である。大便からの哺乳動物の核酸の調製に関連する主な2つの問題がある。第一に、この哺乳動物の核酸を、哺乳動物細胞から遊離させ、バクテリア細胞から分離する必要がある。この段階は、該バクテリア細胞からの核酸の遊離を防止することが望ましいという事実のために、更に複雑である。というのは、該大便検体中の真核生物由来の核酸に比して、莫大な量のバクテリア由来の核酸が存在するからである。第二に、一旦遊離すると、該哺乳動物の核酸は、大便中に存在する比較的高濃度のヌクレアーゼから保護される可能性があり、該ヌクレアーゼは該遊離された哺乳動物の核酸を分解し、結果としてその分析を妨害する恐れがある。本発明においては、該大便を市販品として入手できる溶解バッファーと共にインキュベートすることにより、これらの苛酷な基準を満たすことができる。該溶解バッファーは、少なくとも約500 mMの高濃度のバッファーを含み、そのpHは少なくとも約8.0であり、キレート剤、例えばEDTAを含有し、比較的低い、好ましくは10mM未満の塩濃度を有する。

この大便溶解バッファーは、そのpHおよびキレート特性によって、核酸の分解を最小化し、真核生物細胞を溶解するが、バクテリア細胞を溶解せず、しかも更に処理して、該真核生物の核酸を精製し、および／または濃縮するのに適している。溶解バッファーで処理した後に、該検体を処理（例えば、遠心分離処理）し

て、バクテリアおよびその他の望まぬ残渣を除去する。次に、該溶解物の非一粒状の画分を、SDS(1%)中のプロテイナーゼ(例えば、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ のプロテ

イナーゼK)と共にインキュベートして、ヌクレアーゼおよび他のタンパクを分解する。このサンプル中の該核酸は、更に化学的手段、例えば負に帯電した核酸とイオン交換カラム(iron exchanged columns)とを結合し、その後精製され/濃縮された核酸を溶出することによって分離することができ、および/またはDNAの濃縮を、エタノールを用いた沈殿法により実施することができる。

更に、大便はまた、阻害物質をも含むことが分かっており、これらの阻害物質は、該大便の核酸中に存在する変異体ヌクレオチド配列を、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法によって増幅する場合には、除去することが好ましい。これら阻害物質の一つは、TaqポリメラーゼによるDNA増幅を妨害する。この阻害物質は、該大便の核酸をカオトロピック塩、例えば6.0Mのヨウ化ナトリウムまたは過塩素酸ナトリウムの存在下で、静止状態にあるマトリックスに結合することによって除去することができる。驚いたことに、この目的のために、ガラスが好ましいマトリックスであることを見出した。特に好ましい市販のガラスはプレプ-A-ジェヌ(Prep-A-gene: 登録商標)(バイオーラド(Bio-Rad))およびスピン-バインド(Spin-Bind: 登録商標)(FMC)である。

大便中に存在するその他の阻害物質は、核酸とガラスとの結合を妨害する。この第二の阻害物質は、高濃度例えば少なくとも約1.0Mでの塩の存在下で、該阻害物質を、改良したイオン交換樹脂(例えば、キアゲン(Qiagen))に結合することにより除去できることを見出した。当業者は、一旦哺乳動物の核酸を大便の検体から選択的に得ることができることを認識すれば、大便検体から哺乳動物DNAを濃縮しおよび/または精製するための上記方法を改良できる、種々の方法をもくろむことができる。また、今やこのような方法が大便検体について実施可能であることが公知であるので、当業者は過度の実験を行うことなしに、ここに記載されたものと機能的に等価な他の試薬および条件を確認することができる。このような改良並びに機能的等価物は本発明に含まれる。

本明細書でいうアミノ酸は、以下の3文字または1文字略号に従って同定でき

る。

アミノ酸	3文字略号	1文字略号
L-アラニン	Ala	A
L-アルギニン	Arg	R
L-アスパラギン	Asn	N
L-アスパラギン酸	Asp	D
L-システイン	Cys	C
L-グルタミン	Gln	Q
L-グルタミン酸	Glu	E
L-グリシン	Gly	G
L-ヒスチジン	His	H
L-イソロイシン	Ile	I
L-ロイシン	Leu	L
L-リジン	Lys	K
L-メチオニン	Met	M
L-フェニルアラニン	Phe	F
L-プロリン	Pro	P
L-セリン	Ser	S
L-スレオニン	Thr	T
L-トリプトファン	Trp	W
L-チロシン	Tyr	Y
L-バリン	Val	V

検出前に、該変異体ヌクレオチド配列を増幅することが望ましい場合には、該増幅は増幅用のプライマーであるオリゴヌクレオチドを使用して実施することができる。これら固有のオリゴヌクレオチドプライマーは、該変異体ヌクレオチド配列と隣接するフランキング領域の同定に基づいている。例えば、Ki-rasの場合には、これらのオリゴヌクレオチドプライマーは、該フランキングヌクレオチド配列5'-GGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACCTTATGT-3'(Seq. id. no. 1)および/または5'-AATGGTCCTGCACCAAGTAAT-3'(Seq. id. no.2)およびこれらに相補的な配列とハイブリッド化可能な配列を含む。

本発明の方法に従って使用できる該プライマーは、十分な長さで適当な配列とをもつオリゴヌクレオチドを含んでいて、ターゲット核酸を含むかなりの数の核酸分子の重合を開始させる。このように、興味ある核酸を含有する特定のターゲット核酸配列を、選択的に増幅することができる。具体的には、本明細書で使用する用語「プライマー」とは、2またはそれ以上、好ましくは少なくとも8個のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含む配列を意味し、該配列はプライマー伸長生成物の合成を開始することができ、該生成物はターゲット核酸ストランドに対して実質的に相補的である。このオリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には15-22 またはそれ以上のヌクレオチドを含むが、これはより少ないヌクレオチドを含むこともできる。

合成を行う実験条件は、ヌクレオチドトリホスフェートおよび重合用試薬、例えばDNAポリメラーゼの存在、並びに適当な温度およびpHを包含する。このプライマーは、好ましくは一本鎖である。二本鎖である場合には、該プライマーを、伸長生成物を調製すべく使用する前に、先ずそのストランドを分離するよう処理する。好ましくは、このプライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。このプライマーは、十分に長くて、重合誘発剤の存在下で、伸長生成物の合成を刺激する必要がある。プライマーの正確な長さは、温度、バッファー、およびヌクレオチド組成を含む多くの因子に依存するであろう。

本発明の方法に従って使用するプライマーは、増幅すべき変異体ヌクレオチド配列の各ストランドに「実質的に」相補的となるように設計されている。実質的に相補的であるとは、該プライマーが、該重合試薬が機能可能となるような条件下で、その各ストランドとハイブリッド化するのに十分に相補的である必要があることを意味する。即ち、該プライマーは、これとハイブリッド化する該フランキンギング配列と十分に相補的であり、かつ該変異体ヌクレオチド配列の増幅を可能とすべきである。好ましくは、伸びている該プライマーの末端は、該相補性フランキンギングストランドと、完全な塩基対相補性をもつ。

本発明に従って使用するオリゴヌクレオチドプライマーは、増大された量のターゲット核酸を生成する任意の増幅過程において使用される。典型的には、一つ

のプライマーが、該変異体ヌクレオチド配列の負(-)のストランドに対して相補的であり、他方がその正(+)のストランドに対して相補的である。変性された核

酸に対するプライマーのアニーリング、それに続く酵素、例えば熱的に安定なまたはTaq DNA ポリメラーゼおよびヌクレオチドまたはリガーゼによる伸長は、該ターゲット核酸を含有する、新たに合成された+および-ストランドを与える。これらの新たに合成された核酸はまた、鋳型であるので、変性、プライマーのアニーリングおよび伸長の反復サイクルは、指数関数的な生成物または該プライマーによって画成される領域（即ち、該ターゲット変異体ヌクレオチド配列）を与える。この増幅反応生成物は、使用した特定のプライマーの末端に相当する末端をもつ不連続な核酸二重鎖である。当業者は、同様にターゲット核酸のコピー数を増大するのに使用可能な、他の増幅法を認識しているであろう。

記載されたPCR 生成物のコピー数を増大するのに有用な一つの方法は、半-入れ子式PCR と呼ばれる方法を使用することである。この方法を使用することにより、該もとのプライマーの一つが、新たなプライマーとして利用され、例えば該第一PCR 生成物の3'-領域をフラグging (flagging)する。もう一つの上流側のプライマー、例えば5'-AACTTATGTGTGACATGTTCTAAT-3' (Seq. id. no. 3)を次に、対向するフラグging領域で使用して、新たな、より小さなPCR 生成物を生成することができ、該より小さなPCR 生成物は新たに形成された(famed)PCR 生成物内の正に変異誘発された領域を含む。

本発明で使用するための該オリゴヌクレオチドプライマーは、任意の適当な方法、例えば従来のホスホトリエステルおよびホスホジエステル法またはその自動化された態様を利用して、調製できる。このような自動化された態様の一つにおいては、ジエチルホスホラミダイト(diethylphosphoramidites)を出発物質として使用するが、これはボーケージ(Beaucage)等(Tetrahedron Letters, 1981, 22, pp.1859-1862)により記載されたようにして合成できる。変性された固体担体上でオリゴヌクレオチドを合成するための一方法は、米国特許第4,458,066号に記載されている。本発明に従って使用することのできる一つの増幅法は、米国特許第4,683,202号および同第4,683,195号に記載されているポリメラーゼ連鎖反

応(PCR)法である。

精製または未精製の任意の大便検体核酸を、該出発核酸(1または複数)として使用することができるが、該検体は該ターゲット核酸を含有する特定の核酸

配列を含むか、あるいは含むことが予想されるものである。かくして、本発明の方法は、例えばメッセンジャーRNAを包含するDNAまたはRNAを使用でき、ここでDNAまたはRNAは一本鎖または二本鎖であり得る。RNAを鋳型として使用した場合、酵素および/または該鋳型のDNAへの逆転写にとって最適の条件が使用されるであろう。更に、各々1ストランドを含む、DNA-RNAハイブリッドを使用できる。核酸の混合物を使用することもでき、あるいは同一のまたは異なるプライマーを使用して、ここで前に記載した増幅反応で生成した核酸を使用することも可能である。増幅すべき該変異体ヌクレオチド配列はより大きな分子の一部であり得、あるいは最初別々の分子として存在させ、結果として該特異的配列が、完全な核酸を構築することができる。該増幅すべき配列が最初純粋な形で存在することは必要でなく、複雑な混合物の少量の一部、例えば全ヒトDNAに含まれるものの等であり得る。

該サンプルの該ターゲット変異体ヌクレオチド配列が2つのストランドを含む場合、鋳型として使用され得る前に、該核酸のストランドを分離する必要がある。ストランドの分離は、別々の段階としてあるいは該プライマー伸長生成物の合成と同時に実施することができる。このストランドの分離は、物理的、化学的または酵素的手段を包含する、種々の適当な変性条件を使用して達成できる。ここで、該用語「変性」とは、あらゆるこの種的手段を包含する。核酸ストランドを分離するための物理的な一つの方法は、該核酸を変性するまで加熱する工程を含む。典型的な熱変性は、約80~105℃にて約1~10分間の加熱を含むことができる。また、ストランド分離はヘリカーゼとして知られる酵素群の酵素またはヘリカーゼ活性をもつ酵素RecAによって誘発され、そしてリボ-ATPの存在下にてDNAを変性することが知られている。ヘリカーゼによる核酸のストランド分離に適した反応条件は、クンホフマン-ベーリング(Kuhn Hoffmann-Berling)(CSH-Quantitative Biology, 1978, 43:63)により記載され、またRecAを使用する技術はC.ラ

ッディング(Radding)(Ann. Rev. Genetics, 1982, 16:405-437)において概説されている。

増幅すべき該ターゲット核酸を含有する該核酸が、一本鎖である場合、その補体は、1種または2種のオリゴヌクレオチドプライマーの添加によって合成され

る。単一のプライマーを使用した場合、プライマー伸長生成物は、プライマー、重合用試薬および以下に記載する4ヌクレオチドトリホスフェートの存在下で合成される。この生成物は該一本鎖核酸に対して相補的であり、また一本鎖核酸とハイブリッド化して等しくない長さのストランドの二重鎖を形成するであろう。ここで、該等しくない長さのストランドは、次に単一のストランドに分離され、2種の分離された単一の相補性ストランドを生成することができる。あるいはまた、2種のプライマーを、該一本鎖の核酸に添加して、該反応を上記のように実施することができる。

核酸(1または複数)の相補的ストランドが、該核酸が元々二本鎖であったか一本鎖であったかとは無関係に、分離される場合、該分離されるストランドは、付随的な核酸ストランドの合成用の鋳型として使用可能な状態にある。この合成は、プライマーと鋳型とのハイブリダイゼーションの発生を可能とする条件下で実施する。一般的に、合成は緩衝された水性溶液中で、好ましくは7-9のpH、最も好ましくは約8のpHで生ずる。好ましくは、モル過剰(ゲノム核酸に対しては通常約 10^8 :1のプライマー:鋳型)の該2種のオリゴヌクレオチドプライマーを該分離された鋳型ストランドを含有するバッファーに添加する。しかしながら、相補的ストランドの量は、本発明の方法を診断用途のために使用する場合には知ることができず、従って相補的ストランドの量に相対的なプライマーの量は確実性をもって測定することができないと、理解すべきである。しかしながら、実際には、添加されるプライマーの量は、一般的には、増幅すべき配列が複雑な長鎖核酸ストランドの混合物中に含まれている場合には、相補性ストランド(鋳型)の量を越えるモル過剰であろう。この方法の効率を改善するためには、モル大過剰であることが好ましい。

幾つかの増幅態様において、例えばデオキシリボヌクレオチドトリホスフェー

トdATP、dCTP、dGTP、およびdTTP等の基質を、該プライマーとは別々にまたは一緒に、十分な量で該合成混合物に添加し、得られた溶液を約90-100℃にて、約10分間、好ましくは1～4分間加熱する。この加熱時間の経過後、該溶液を、該プライマーのハイブリダイゼーションにとって好ましい室温まで冷却する。この冷却した混合物に、プライマー伸長反応を実施するのに適した試薬（本明細書では

「重合用試薬」と呼ぶ）を添加し、この反応を当分野で公知の条件下で生ぜしめる。この重合用試薬は、これが熱安定性である場合には、他の試薬と共に添加することもできる。この合成（または増幅）反応は、室温から該重合用試薬が最早機能しない温度以上までの温度にて起こり得る。従って、例えばDNAポリメラーゼを、この試薬として使用した場合には、該温度は一般的に約40℃よりも高くない。最も有利には、この反応は室温で起こる。

該重合用試薬は、酵素を含むプライマー伸長生成物の合成を達成するように機能するであろう、任意の化合物または系であり得る。この目的のために適当な酵素は、例えばE.コリDNAポリメラーゼI、Taqポリメラーゼ、E.コリDNAポリメラーゼIのクレノー(Klenow)フラグメント、T4DNAポリメラーゼ、他の入手可能なDNAポリメラーゼ、ポリメラーゼ変異体逆転写酵素、リガーゼ、および熱安定性酵素（即ち、変性を生ずるのに十分に高い温度に暴露した後に、プライマー伸長を達成するこのような酵素）を含むその他の酵素を包含する。適当な酵素は、各変異ヌクレオチドストランドに対して相補的である該プライマー伸長生成物を形成するのに適した様式での、該ヌクレオチドの組み合わせを容易にするであろう。一般的に、この合成は各プライマーの3'末端で開始され、合成が完了するまで、異なる長さの分子を生成している、該鋳型ストランドに沿った5'方向に進行するであろう。しかしながら、上記と同様な方法を利用して、合成を各5'末端で開始し、他の方向に進行させる、重合用試薬も存在し得る。何れにしろ、本発明の方法は、ここに記載する増幅態様に制限されるものではない。

これらの新たに合成された変異ヌクレオチドストランドおよびその相補的核酸ストランドは、上記のハイブリッド化条件下で二本鎖分子を形成し、かつこのハイブリッドは本発明の方法の後の段階で使用される。次の段階において、該新た

に合成された二本鎖分子を、上記手順の何れかを使用して、変性条件に付して、一本鎖分子を得る。

上記の方法を、該一本鎖分子について繰り返す。必要ならば、追加の重合用試薬、ヌクレオチドおよびプライマーを添加して、上記条件下で該反応を進行させることができる。再度、該合成は該オリゴヌクレオチドプライマー各々の一端で開始され、該鋳型の一本鎖に沿って進行して、追加の核酸を生成する。この段階

後、該伸長生成物の半分が、該2つのプライマーにより結合された、特定の核酸配列からなるであろう。

該変性および伸長生成物合成の段階は、必要な頻度で繰り返して、検出に必要な程度まで、該ターゲット変異ヌクレオチド配列を増幅することができる。生成される該変異ヌクレオチド配列の量は、指数関数的な様式で蓄積される。

この増幅された生成物を検出し、自動的に温度制御した電気泳動法および銀染色法用のファルマーシアファーストシステム (Pharmacia Phast System for Automatic Temperature Controlled Electrophoresis and Silverstaining) を利用して、これを一本鎖配座多形性により分析することで同定することができる。このような方法において、例えば増幅したDNAの少量のサンプルを変性し、次に、例えばファルマーシア社から提供される予備注型したファーストゲル上で電気泳動に付す。このようなゲル中で、一本鎖DNAフラグメントは、その配座に依存して移動するであろう。該配座はヌクレオチドの該プライマー配列に依存し、また一または幾つかのヌクレオチドだけ変った配列は、特定の固有の配座を含む。

本発明の一態様においては、増幅後の、大便由来のヌクレオチドフラグメントを、ファルマーシアファーストゲル上でのゲル電気泳動法により、異なる配座のフラグメントに分離する。電気泳動後、該ゲルを銀を含有する混合物に暴露して、種々のヌクレオチドフラグメントを染色し、かくして種々の型の変異ヌクレオチドフラグメントを検出し、かつ同定する。

実施例1：ミニゲル一本鎖配座多形性による、Ki-rasエキソン1の検出および同定

一本鎖配座多形性(SSCP)は、突然変異を検出するのに有利な方法である(40)。

この方法は、非一変性条件下にある一本鎖DNA フラグメントにより推定された配座およびその結果としてのその電気泳動における移動度が、その正確な塩基配列に依存しているという事実に基づいている。SSCPによれば、突然変異は、一般的にこれを検出した後に同定される。しかしながら、該癌遺伝子Ki-rasの場合には、限られた数の突然変異が報告されており、その大多数はエキソン1のコドン12および13に限られている。従って、各突然変異の変異株が特徴的なSSCPパターン

をもつ場合には、同定の基礎が存在する。このことは、幾つかの以前のKi-rasに関する文献に示されている(18,41,42)。

本研究では、一般的に報告されている、Ki-rasエキソン1の突然変異変異株全てが、検出可能であり、かつ同定可能である場合の、SSCPプロトコルを説明する。更に、2種の他の変異株(我々の知見では、外科的生検資料には以前に報告されていない)も、検出された。このプロトコルは、予備注型したポリアクリルアミドゲルならびに自動電気泳動および染色装置(ファーストシステム(Phast system), スウェーデンのファルマーシア社)を使用している。DNAの同位体標識は含まれていない。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をパーキンエルマー(Perkin Elmer)TCLサーモサイクラー上で、2段階プロフィール、即ち94℃にて15秒間、58℃にて30秒間を利用して、鋳型の量に依存して30-40サイクル実施した。このプロフィールに先行して、94℃にて2分間および72℃にて5分間で終了する処理を行った。使用したプライマーは5'-AACCTTATGTGTGACATGTTCTAAT-3'(Seq. id. no.4)(上流側)および5'-AATGGTCCTGCACCAAGTAAT-3'(Seq. id. no.2)(下流側)であった。このPCR反応混合物は10mMのトリス(Tris)-HCl、pH 9.0、50mMのKCl、1.5mMのMgCl₂、0.01%(w/v)のゼラチン、0.1%のトライトン(Triton)、125 μMの各dNTP、0.2 μMの各プライマーおよび0.2 μMのTaqポリメラーゼ(UK HTバイオテクノロジー社(Biotechnology Ltd.)のスーパータック(Supertaq))を全体積100 μl中に含むものであった。該生成物のサイズは221 bpであった。

SSCPプロトコル: 4 μlの該PCR生成物を、等体積のイオン化したホルムアミドと混合し、手短に80℃に加熱することにより変性した。次の氷上での迅速

な冷却は、変性状態にある該DNA中に保持されている必要はなかった。これらサンプルを、0.88MのL-アラニン、0.25Mのトリス、pH 8.8を含有するバッファーストリップによって、20%の均質なポリアクリルアミドゲル（ファーストゲル）に適用し、以下のプログラム、即ち予備実験：400V、10mA、2.5W、15℃、100 Vh；ローディング：400V、1mA、2.5W、15℃、3 Vh；分離：400V、10mA、2.5W、15℃、300 Vhに従って実験した。電気泳動後、該ゲルを製造業者等の指示に従って銀染色した。この手順を利用して、24サンプルを2時間以内に分析することができた。

きた。

7種の最も一般的に報告されているKi-rasエキソン1突然変異(7)の全ておよび一般的でない一つの二重突然変異(コドン12: GGT ~ TTT)が、ここに提示した方法によって検出可能であり、かつ同定可能であることを立証した(第1図)。これらの突然変異は全て、多数の肺、結腸および膵臓腫瘍生検体(n > 400)をスクリーニングした際に見出された。該突然変異の同一性を、バンドパターンの個々の型を表す少なくとも2つのサンプルを配列決定することにより確立した。その上、更なるサンプルを、コントロールとしての、対立遺伝子特異的増幅(ASA)技術(20)によって分析した。各場合において、野性型のバンドに加えて、2つ(あるいは恐らく準安定な配座を表す第二のバンドのために、しばしばそれ以上)のバンドとして該突然変異が出現した。これは、突然変異誘発された両一本鎖が、野性型的一本鎖とは異なる移動性を示すことを意味すると解釈された。従って、種々の突然変異変異株と、2つの野性型の特異的なバンドに相対的な、折々のPCR-生成の非特異的バンドとの間の識別を可能とした。これは信頼性の高い同定に対する必要条件であると認められた。

検出可能な突然変異に必要な、突然変異したDNA対正常なDNAの最小比を、以下のようにしてテストした。即ち、同型接合AGT突然変異をもつゲノムDNAを、以下の比、即ち1:10、1:20、1:40、1:80および1:160にて正常なゲノムDNAと、結合量を一定に維持し、かつ250 ngとなるように混合した。次いで、これらの混合物を、35サイクルのPCR反応における鋳型として使用した。その後、SSCP分析

を該PCR生成物上で実施した。この突然変異シグナルは全てのサンプル中で検出可能であるが、該混合比(変異DNA/正常DNA)が1:160(結果は提示せず)の場合のみ困難であった。

上記の突然変異に加えて、結腸癌生検において発見された、コドン19: TTG ~ TTT の最後の塩基における突然変異も、検出可能であり、また他の突然変異(提示せず)から識別可能であった。

突然変異の同定に対するSSCPの使用は、特異的な突然変異の限られたスペクトルが生じると報告されている、特殊な場合においてのみ可能であることに注意すべきである。提示された場合において、該SSCPパターンの立証された不均質性は、

SSCPのみによるKi-rasエキソン1突然変異の迅速、単純かつ高感度の検出および同定を簡略化した。

実施例2: PCR を利用した、結腸直腸腫瘍をもつ患者の大便中のKi-ras突然変異の検出

II 物質および方法

患者の選択

ノルウェイのベルゲンユニバーシティーホスピタル(ホークランドホスピタル)の外科部門に対して1994年8月から11月までの間に許諾された25名の患者を、この研究で使用した。我々は、我々の使用する方法の感度の判定を可能とする、2つの異なる群を含むように選択する。第一群(A)は、結腸直腸腫瘍の疑いについて結腸内視鏡検査を受け、かつ後にサイズ1 cmを越える悪性結腸直腸腫瘍(癌)または良性腫瘍(腺癌)の何れかをもつことが分かった10名の患者で構成された。他の群(B)は、15名の患者で構成され、該患者はサイズ1 cmを越える結腸直腸癌または腺癌の外科的切除を受けた者であった。これらの患者(10名の男性、15名の女性)の年齢は、腫瘍の摘出時点において49~90歳(平均70歳)であった。

腫瘍および大便の採集

各患者の腫瘍組織サンプルを集めたが、多くの場合外科手術および結腸内視鏡

術後直接採取した。後者の例において、組織サンプルは生検またはポリープ切除術を通して入手した。5名の患者からの、パラフィンに包埋した組織ブロックがホークランドホスピタルの病理部門により与えられた。全部で27個の結腸直腸腫瘍検体を、25名の患者から得た。2名の患者からは、全部で4種の異なる腫瘍を得、これらは我々の基準を満たし、これらの腫瘍は該外科的に摘出された検体中で共存していることが分かった。病理報告によれば、これら27例の腫瘍中の15例は癌であり、12例は腺癌であった。

大便サンプルは、洗浄液の収集を通して結腸内視鏡術中にあるいは外科手術前に入手した。これらのサンプルは -80°C にて保存した。

腫瘍サンプルからのDNAの調製

ゲノムDNAを、以下の標準的方法¹⁰に従って、腫瘍サンプルから抽出した。

約25mgの腫瘍組織を、1.5 mlのエッペンドルフ管に集めた。細胞を溶解する目的で、このサンプルを300 μl のTEバッファー (10mMのトリス-HCl, pH 8.0および1 mMのEDTA)、30 μl のプロテイナーゼXIV(10mg/ml)、30 μl の10% SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)および30 μl のTNE バッファー (100 mMのトリス-HCl, pH8.0, 1.5MのNaClおよび100 mMのEDTA, pH8.0)中に溶解した。このサンプルを 37°C にて一夜インキュベートした。

このサンプルからタンパクおよび汚染物質を除去するために、フェノール/クロロホルム抽出を実施した。即ち、各サンプルに1容量のフェノールを添加し、攪拌により混合し、 4°C にて、13000gで5分間遠心分離処理した。次いで、その上澄を新たな管に移し、その後クロロホルム1容を添加し、この溶液を攪拌により混合し、5分間遠心分離した。上部の水性層を新たな管に移し、2.5容の96%エタノールを添加した。少なくとも1時間、 -20°C にて沈殿させ、該サンプルを10分間遠心処理し、その後得られた上澄を注意して捨てた。得られたペレットを70%エタノールで洗浄し、次いで風乾した。最後にこのDNAを100 μl のTEバッファー中に再懸濁した。

パラフィン包埋組織ブロックからのDNAを、最近記載された方法¹¹を利用して抽出した。

20 μ mの部分を該組織ブロックから切取った。この部分を、5%のシェレックス (Chelex)-100樹脂(USA、カリフォルニア州、ハーキュルスのバイオラド社(Bio-Rad Laboratories)製)を含有する、10mMのトリス-HCl、pH 9.0中に懸濁させ、10分間煮沸した。

ポリメラーゼ連鎖反応手順

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、分子生物学の最も広範に利用されている技術の一つとして確立されている。その理由は以下の通りである。即ち、これが少量の起源物質から、 μ g量のDNAを製造するための迅速、安価かつ単純な手段であ

るからである。このPCR技術は、興味の対象の領域の回りの、DNA配列の少なくとも一部に関する知見に依っている。我々は、この研究で実施した該手順に戻る前に、先ずPCRの基本的原理を簡単に説明する。

PCRにおいては、増幅すべき二本鎖DNAフラグメント(鋳型)を、該増幅すべき配列の何れかの末端における配列と相補的な、2つの短い一本鎖DNA分子(プライマー)と混合する。この反応混合物は、また熱安定性のDNAポリメラーゼ、およびDNA合成に必要な4種のヌクレオチドをも含有する。

この混合物を約95℃まで加熱して、該二本鎖の鋳型を一本鎖に変性し、次いで約60℃に冷却して、該一本鎖の鋳型上で、各プライマーをその相補的配列と共にアニールすることを可能とした。次いで、温度を72℃に調節した。この温度は、ヌクレオチドの連続的な添加による各プライマーの伸長を通して、該ポリメラーゼが新たなストランドを合成するのに最適な温度である。各新たに合成したDNAストランドは、他のプライマーに対する結合サイトを含み、従って次のサイクルの付随的な鋳型として機能する。このサイクルを、複数回繰り返し、各時点で生成物の量は倍加する。PCRの増幅強度の印象を与えると、20サイクルが、1 DNA分子の百万個のコピーを生成する¹²⁻¹³。

Ki-rasのエキソン1を、以下の条件下でPCRにより増幅した。2 μ lの溶解したDNAを、10mMのトリス-HCl(25℃でのpH 9.0)、50mMのKCl、1.5mMのMgCl₂、0.01%(w/v)のゼラチン、0.1%のトライトンX-100、125 μ Mの各デオキシヌクレオチドトリホスフェートおよび0.5 μ Mの各プライマーを含有する、全体積100

μ l 中で増幅した。0.2 単位のTaq DNA ポリメラーゼを添加した。このTaq DNA ポリメラーゼ（スーパータック）は、HTバイオテクノロジー社（英国、ケンブリッジ）から購入した。

この反応を、2段階プロフィール、即ち94℃にて15秒間（変性）、60℃にて30秒間（アニール／伸長）を利用した、DNA サーマサイクラー（USA、CT、ノルウォークのパーキン・エルマー・シータス(Perkin-Elmer Cetus)社）上で、40サイクル実施した。このプロフィールに先立って、94℃にて2分間（単一変性段階）および72℃にて4分間の最終伸長段階を実施した。オリゴヌクレオチドプライマーは以下の通りである：上流側：5'-AAC CTT ATG TGT GAC ATG TTC TAA T-3' (Seq. i

d. no.5) (R1と命名した) および下流側：5'-AAT GGT CCT GCA CCA GTA AT-3' (Seq. id. no.2) (R2)。これらのプライマーは長さ221塩基対(bp)をもつ生成物を与えた。

腫瘍サンプルにおけるKi-ras突然変異の同定

単一塩基変化が、増幅されたDNA中に存在するか否かを決定するための幾つかの方法がある⁽¹⁴⁻²¹⁾。これらのうち、我々は迅速かつ高感度であることが示されている一つの方法、即ち一本鎖配座多形性解析(SSCP)²²⁻²⁴を選択する。

DNAは負に帯電したヘテロポリマーであるから、電場内に配置された場合には正極に向かって移動するであろう。これが電気泳動と呼ばれる。

本研究室において、分子篩の原理がしばしば利用される。この手順を使用することにより、種々の分子、例えば種々のDNAフラグメントの選択されたものを、ゲルと呼ばれる水和された有機ポリマーの網状構造中で、強制的に運動させることにより分離することができる。該DNAフラグメントの移動速度は、そのサイズおよび／または形状に従って遅延されるであろう。

このSSCP技術は、等しいサイズの小さな(100-400 bp)一本鎖DNAフラグメントのある特性を利用している。即ち、それ自体が折り畳まれた場合、これらは別の構造（配座）を形成するであろう。これらの配座は分子内相互作用およびその結果としてのその配列によって決定される。従って、点突然変異は、好ましいパッ

ファースト条件およびゲルの孔径の下で、電気泳動中に変化した移動度を与えるであろう、配座の変化として反映されるであろう。相補的ストランドは種々の配座を示すので、野生型（正常、未変更）DNA フラグメントは、該ゲル中で2つのバンドとして出現する。点突然変異は2つの追加のバンドを与える²⁵。実際に、付随的なバンドがしばしば現れ、これらは交互配座によるものである。

本研究において、PCR 生成物の電気泳動は、ファルマーシアファーストシステム（スウェーデン、ウプサラのファルマーシアLKB バイオテクノロジー）を使用して、予備注型したポリアクリルアミドミニーゲル（ファーストゲル（PhastGels））上で実施した。

SSCPプロトコール：該PCR 生成物を、ホルムアミドと混合し、80℃にて1分間加熱することにより変性した。次いで、このサンプルを、0.88 MのL-アラニン、0.25 Mのトリス、pH8.8を含有する、ファーストゲルの未変成（native）バッファーストリップを使用して、20%の均質なポリアクリルアミドゲルに適用し、以下のプログラムに従って実験した：予備実験：400V、10mA、2.5W、100 Vh；ローディング：400V、1 mA、2.5W、3 Vh；分離：400V、10mA、2.5W、300Vh。電気泳動後、該ゲルを製造業者等の推奨に従って銀染色し、乾燥した。

この記載した方法を利用して、Ki-rasのコドン12および13における各突然変異を、該ファーストゲル上に別々のバンドパターンとして示した。各突然変異の同一性は、以前に、直接配列決定および突然変異特異的プライマー伸長（後に論ずるMSPE）によって確立した²⁶。本研究においては、これらのパターンを、該腫瘍サンプルにおける突然変異の型を確立するための基準として使用した。

全ての腫瘍サンプルを、該Ki-rasのエキソン1中の突然変異の存在について分析した。次に、腫瘍が突然変異を含むこれらの患者からの大便サンプルを分析した。

大便サンプルからのDNAの調製

キアゲン（Qiagen）細胞培養DNA キット（USA、CA州、チャットワースのキアゲン（Qiagen）社）を使用して、大便からのゲノムDNAを精製した。

約10mgの大便を1 mlのG2バッファと混合した。結腸内視鏡術の洗液から、50

0 μ l を採取し、等量のG2バッファーを添加した。このバッファーは、核を溶解し、かつあらゆる種のタンパクを変性する。この大便-溶解バッファー混合物を攪拌し、4℃にて13,000gの下で10分間の遠心分離処理により清澄化した。次いで、該上澄を新たな管に移し、その後25 μ l のプロテイナーゼK(20mg/ml)を添加した。このプロテイナーゼは該変性されたタンパクをより短いフラグメントに消化する。次いで、このDNA から全ての結合したタンパクをはぎ取る。50℃にて60分間のインキュベート後、キアゲン(Qiagen)ゲノムチップを廃棄物トレー上に置き、1 mlの平衡化バッファーQBTにより平衡化した。次に、該サンプルをこの平衡化したゲノムチップに適用し、その後このカラムを、QC洗浄バッファー4×1ml

で洗浄した。次に、このカラムを清浄な収集管に入れ、適当な体積の溶出バッファーQFを添加した。該DNA を0.7 容のイソプロパノールで沈殿させ、手動で混合し、4℃にて10分間、13000gの下で遠心分離処理し、そして上澄を注意して除去した。該DNA を70% エタノールで洗浄し、次に遠心分離処理によって再度ペレット化した。これらのサンプルを10分間風乾し、最後に該ペレットを50 μ l のTEバッファー中に再溶解した。

大便サンプル中のKi-ras突然変異の検出

該Ki-ras遺伝子のコドン12または13内の予想される突然変異をチェックするために、我々は対立遺伝子特異的増幅(ASA)とも呼ばれる、突然変異特異的プライマー伸長(MSPE)を利用した²⁷⁻³⁰。

このMSPEの方法は、PCRにおいて優先的に一方の配列が他方の配列よりも増幅されるであろう(該配列がただ一つの塩基だけ異なる場合においてさえ)、プライマーの設計に依存する。このことは、該プライマーが該所定(突然変異含有)の配列と完全に一致するが、3'末端またはその近傍において他の配列(突然変異を含まない)と不一致である場合に実現される。正常(突然変異誘発されていない)なDNA 鋳型と、該オリゴヌクレオチドとの間のミスマッチは、この正常なフラグメントの貧弱な増幅を与える。

MSPEの特異性に関するより高い信頼性は、突然変異-特異的プライマーが、ミスマッチの代わりに伸長(即ち、増幅)の確率がより一層減じられるような、該

3'末端近傍における追加の意図的なミスマッチによって、不安定化される³¹。

ミスマッチプライマーは、該3'末端から数塩基対離れた付随的なミスマッチを包含する、市販のコンピュータプログラム(USA、ナショナルバイオサイエンス社(National Biosciences Inc.のオリゴ(Oligo)4.0)によって選択された。本研究において使用した全てのプライマーは、購入したものであった。

MSPEに対して、我々は(半)入れ子式PCR 手順およびアンプリワックスゲムズ(AmpliWax gems)を使用した。

入れ子式PCR において、DNA 増幅の感度および特異性は大幅に改善されている³²⁻³⁴。この方法は連続的な2つのPCR を含む。その第一のPCR は一对の外側プ

ライマーを含み、一方その第二のPCR は、該第一のプライマー対(入れ子式PCR)あるいは該第一のプライマーの一方、即ち単一の入れ子式プライマー(半-入れ子式)に対して内側となる2つの入れ子式のプライマーを含む。この第一の反応により生成されるより大きなフラグメントは、該第二のPCR の鋳型として使用される。

PCR アンプリワックスゲムズ(AmpliWax Gems; パーキンエルマー(Perkin-Elmer))は「ホットスタート(hot start)」技術の使用を簡単化する。この技術は、該反応が、プライマーの非-ターゲットDNA への非-特異的アニールを最小化する温度に達するまで、PCR 反応体の完全な混合を防止する。結果として、このPCR法の特異性および感度は高められ、かつプライマーの二量体化(プライマー-プライマーアニール)の危険性が減じられる^{35,36}。

PCR 手順

第一ラウンドにおいて、5 μ l の溶解したDNA を、上記腫瘍サンプルと同様の反応混合物中で、0.2 μ Mのプライマー濃度にて増幅した。該上流側プライマーの配列は5'-GGT GGA GTA TTT GAT AGT GTA TTA ACC TTA TGT-3'(R3)(Seq. id. no.1)であった。また、該下流側のプライマーはR2(Seq. id. no.2)であった。これらのプライマーは長さ244 bpのフラグメントを生成した。94℃にて2分間の変性後、PCR を16サイクル(94℃にて15秒間、60℃にて15秒間)実施した。

各サンプルにおける該鋳型の増幅度は、MSPEを実施する前にチェックした。

該第一ラウンドのPCR 生成物 $1 \mu\text{l}$ を、プライマーR1(Seq. id. no.5)およびR2(Seq. id. no.2)($0.5 \mu\text{M}$)を使用して、PCR を40サイクル (94℃にて15秒間、60℃にて30秒間) 実施することによって再度増幅した。 $15 \mu\text{l}$ のアリコートをし、3%ヌシーブ(NuSieve)GTG(FMCバイオプロダクツ(BioProducts)社)アガロースゲル上での電気泳動によって分析した。増幅されたことが立証された該第一ラウンドからのこれらサンプルをMSPEにかけた。

該第二のPCR ラウンドにおいて、我々はアンプリワックスゲムズとホットスタート技術とを組み合わせた。該第一のラウンドからのPCR 生成物 $1 \mu\text{l}$ を、プライマーR3($0.2 \mu\text{M}$)および突然変異特異的 mismatches プライマーの組み合わせによ

り再度増幅した。該 mismatches プライマーは以下の配列を有していた: GCT:5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA G-3'(R4)(Seq. id. no.11); GTT:5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA A-3'(R5)(Seq. id. no.6); GAT:5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA T-3'(R6)(Seq. id. no.7); GAC:5'-CGT CAA CGC ACT CTT GCC TAC CT-3'(R7)(Seq. id. no.8); AGT:5'-AGG CAC TCT TGC CTA CGC TAT T-3'(R8)(Seq. id. no.9); TGT: 5'-GCA CTC TTG CCT ACG CCA TA-3'(R9)(Seq. id. no.10)。

R3(Seq. id. no.1)と該 mismatches プライマーとの組み合わせは、143(TGT)~150(AGT)bpの生成物を与えた。PCR は、プライマー濃度 $0.2 \mu\text{M}$ (R4,R5)(Seq. id. no.11; Seq. id. no.6)または $0.4 \mu\text{M}$ (R6-R9)(Seq. id. no.7-10)にて、40サイクル (94℃にて15秒, 60℃にて30秒) 実施した。我々が1腫瘍中に見出した、該TTT 突然変異をチェックするために、我々は該大便のサンプルについてGTT およびTGT mismatches 両者を実施した。両シリーズが正の結果を生ずるであろう場合にのみ、腫瘍細胞を含む、TTT-突然変異が該大便中に存在していると推定できた。

負のコントロールとして、我々はKi-rasのコドン12および13に突然変異をもたない、結腸直腸腫瘍に罹った患者の大便からのDNA を使用した。最良の増幅を示したこれらサンプルを選択して、誤った正の結果の発生機会を最小化した。正のコントロールとして、Ki-ras中の突然変異の型をSSCPにより確立し、かつ配列決定により確認した腫瘍からのDNA を使用した。MSPE生成物を3%ヌシーブ(NuSieve

)アガロースゲル中での電気泳動にかけた。正として指定したシグナルは、該負のコントロールよりも強力な、明確な強いシグナルであることを必要とした。

結果

2段階実験法を創案した。我々は、先ずKi-ras突然変異の存在について、結腸直腸腫瘍を分析した。これが存在する場合には、これら患者の大便を分析した。結果を以下の第1表にまとめた。

第1表：Ki-ras突然変異中の突然変異について研究した患者および腫瘍の特徴

患者	性別/ 年齢	腫瘍位置	腫瘍の型/ 段階#	腫瘍突然変異	大便中の 突然変異##
C-01	M/79	直腸	癌/B	GGT→GCT(Ala)	I/II: +
C-04	F/69	下行性結腸	腺癌	GGT→GTT(Val)	I: +
C-05	F/90	横断性結腸	腺癌1	GGT→TTT(Phe)	II: -
		上行性結腸	腺癌2	GGT→GAT(Asp)	
C-09	F/63	上行性結腸	癌/C	GGT→GAT(Asp)	II: +
C-12	F/80	直腸	腺癌	GGT→GAT(Asp)	I: +
C-14	M/71	S状結腸	癌/B	GGT→GAC(Asp)	II: +
C-16	F/75	S状結腸	癌/C	GGT→GAT(Asp)	II: -
C-17	M/87	S状結腸	癌/C	GGT→AGT(Ser)	II: -
C-18	F/77	S状結腸	癌/B	GGT→GTT(Val)	I: +
C-23	M/80	S状結腸	癌/B	GGT→GTT(Val)	II: +
C-24	F/68	直腸	癌/B	GGT→GAT(Asp)	II: -
C-25	F/49	直腸	癌/C	GGT→GCT(Ala)	II: +

腫瘍は、CRCのデュークス(Dukes')古典的3段階システム⁷¹に従って分類した(A:腫瘍は筋肉固有層に制限された; B:筋肉固有層を介して拡がるが、結腸に制限された; C:局所リンパ節への転移)。

大便サンプルは、結腸内視鏡術中(I)、または外科手術前(II)に採取した。患者C-01からの、大便サンプルIおよびII両者を分析した。

腫瘍突然変異は、一本鎖配座多形性およびファーストゲル上での電気泳動によ

り決定した。大便サンプル中の突然変異は、突然変異特異的プライマー伸長により立証した。

27個の腫瘍由来のゲノムDNAを、PCR-SSCP技術によって、該Ki-ras遺伝子の12番目および13番目のコドンにおける突然変異の存在について分析した。ファーストシステム(PhastSystem)を使用して、ポリアクリルアミドゲル電気泳動および銀染色を実施した。バンドパターンを第2図に示した。

我々は13個の腫瘍サンプル(48%)中に点突然変異を検出したが、これらは12名の患者(群Aからの4名および群Bからの8名)から得たものであった。突然変異は、12例の腺癌中の4例において(33%、全て絨毛型)、また15例の癌中の9例(60%)において検出された。該突然変異の大多数はS状結腸および直腸に局在していた。

本研究に組み入れられた15名の女性の患者のうち、8名(53%)がKi-rasに突然変異を有し、一方で10名の男性患者中の4名(40%)が冒されていた。一名の患者(C-05)において、2種の異なる腺癌から得たサンプルは、異なる突然変異を含むことが分かった。

該腫瘍の突然変異スペクトルを第3図に示す。最も高頻度の突然変異は5例において観測された、コドン12におけるGGTからGAT(グリシンからアスパラギン酸)なる突然変異であった。同一のコドンにおいて我々が見出したその他の突然変異は、GGTからGTT(グリシンからバリン、3例)、GGTからGCT(グリシンからアラニン、2例)およびGGTからAGT(グリシンからセリン、1例)であった。我々は、コドン13における突然変異1例、即ちGGCからGAC(グリシンからアスパラギン酸)をも見出した。

1種の腫瘍(C-05, 腺癌1)は、前のコドン12(GGTからTTT)における二重の突然変異に関連するパターンと類似する、異常なバンドパターンを与えた。PCR生成物の配列解析は、この二重の突然変異を確認していた(第4図)。

次に、我々は、腫瘍が突然変異を含んでいる12名の患者からの大便サンプルを解析した。群Aからの1名の患者(C-01)は、結腸内視鏡検査後即座に手術され、従って我々は該内視鏡術サンプル以外に予備-外科手術サンプルをも得た。

大便からのDNAを精製した後、Ki-rasのエキソン1をPCR増幅した。内視鏡術サンプルが、該予備-外科手術サンプルよりも多量のヒトDNAを含有していることが、直ぐに明らかとなった。内視鏡術中の腫瘍の回りの液を洗浄する機械的作用が、見掛け上ルーメン中への細胞の遊離を引き起こした。従って、細胞の全量および腫瘍-由来の細胞画分の両者は、一般的に内視鏡術中に得られたサンプル中においてより高かった。

出発物質の任意の量に対して通常十分である、40サイクルの1-段階PCRは、大

便サンプルの幾つかに対しては明らかに不十分であったが、これは恐らく該大便中の「阻害性因子」によるものである。我々は、入れ子式PCRを実施することにより、これら因子を希薄化することによって、PCRの効率を高めようと考えた。これは、またMSPEに対する鋳型の量を増大するであろう。

この2-段階PCR法を利用することによって、群AおよびB両者からの全ての大便サンプルが、増幅可能であり、従ってMSPEに対して適していることが明らかになった。MSPEに対する鋳型は、該第一ラウンドからの該PCR生成物の $1\mu\text{l}$ であった。アンプリワックスゲムズおよび該ホットスタート技術を組み合わせた。正および負のコントロールを含めた。

このようにして、我々は、群Aからの全体で4個の大便サンプル中の、各腫瘍中に見出された突然変異を確認した。群Bから得た(+1例、即ちC-01)大便サンプルにおいて、我々は9例中5例において突然変異を同定した。近位および遠位の腫瘍(患者C-09, 上行性結腸)は、正の結果を与えた。4種の異なる型の突然変異: GCT, GTT, GAT およびGACを検出した。

最適の結果を得るためには、該突然変異特異的プライマーの濃度を、 $0.2\sim 0.4\mu\text{M}$ の範囲で変動する値に調節する必要があった。

MSPEによる大便中のKi-ras突然変異の検出の代表的結果を第5図に示す。

考察

本研究において、我々は、結腸直腸腫瘍に罹患した患者の大便中における、Ki-ras突然変異の検出の可能性を探究した。27例の腫瘍(12例の腺癌および15例の癌)中に、Ki-ras突然変異を13例の腫瘍中に、即ち4例の腺癌(33%)および9例

の癌(60%)中に見出した。これらの頻度は、初期の報告^{4,5}による。これらの結果は、結腸直腸腫瘍形成の比較的初期のマーカーとしての、Ki-ras突然変異の大きな役割を明らかにしている。

最近、女性が男性よりも、結腸直腸癌におけるKi-ras突然変異の高い罹患率をもつことが観測された⁶。この差異は、大便中の特定の発癌物質との接触時間および該物質の濃度に関連していることが提案されている。腸の通過時間および便秘罹患率の両者が、女性において実質上高いことが報告^{3,8}されている。この性による

差異を反映するものは、我々の資料においてみることができ、そこでは女性の腫瘍の53% および男性の腫瘍の40% が突然変異を含んでいることが分かった。

我々は、該突然変異の大多数(77%)を2つの突然変異と考えると、14例中12例がコドン12および13の位置2において生じていることを見出した。このことは、以前にも認識されていた^{2,3,6}。

本研究で検討した腫瘍の数は少ないが、最も一般的であると考えられる3種の突然変異(CAC、GAT およびGTT)の全体としての頻度は、驚いたことにより大きな系で見出された頻度^{7,8}に近いものである。

幾つかの点突然変異は、明確な解剖学的位置と関連付けられている^{4,9}。この点に関連して、該GCT 突然変異についての我々の結果は、この突然変異が直腸に限られていると思われるとの観測と一致している。

幾つかの型のKi-ras突然変異と臨床的段階との相関、例えば最近説明された、GAT 突然変異のデュークスB段階腫瘍への限定⁹は、我々の患者の資料では認識されなかった。事実GAT 突然変異をもつ5例の腫瘍のうち、2例がデュークスCとして分類された。

我々は、腫瘍がKi-ras突然変異を含む12名の患者からの大便サンプル(1名の患者からは結腸内視鏡術および予備-外科手術サンプルの両者)を分析した。我々は、13例(結腸内視鏡術サンプル4例および予備-外科手術サンプル9例)の大便サンプルのうち9例中に、対応するKi-ras突然変異を同定できた。この同定は、結腸内視鏡術サンプル4例全体中で達成され、また予備-外科手術サンプル9例中5例について達成された。後者のサンプルのみが、診断的価値がある。正

に、該結腸内視鏡術サンプルは、この方法を評価する際の価値ある情報を与えた。

これら全ての大便サンプルの増幅性は確立されたが、MSPEは何れのサンプルでも正の結果を与えなかった。可能な説明として、多数の問題点を認識することができる。第一に、前に述べたように、大便サンプルは、多分全粘膜-細胞含有率および腫瘍由来の細胞画分の両者に関して著しく異なっている。第二に、大便からのヒト細胞の精製は、恐らくバクテリア細胞の存在によって妨害されている。もう一つの問題は、ヒト細胞が、該大便中の比較的高い濃度の分解酵素に暴露されているという事実に関連する。更に、大便は幾つかの阻害物質を含み、該阻害

物質がPCRにおけるDNAの増幅を妨害している¹ことが知られている。DNAを変性されたイオン-交換樹脂（例えば、本研究で使用するキアゲン(Qiagen)）と結合することにより、これらの阻害性物質を、少なくとも部分的に除去できた。

該MSPE法自体は、大便中のKi-ras突然変異の検出に非常に適していると思われる。大便サンプルの分析は、正常な細胞由来の豊富な野性型のKi-rasの中から、該腫瘍細胞由来の変異誘発されたKi-ras配列を検出することを必要とした。この方法の感度を設定するための実験は、MSPEが、異種細胞集団（未公開データ）中の少なくとも0.01%の変異誘発された細胞を検出することができることを立証した。MSPEのもう一つの特徴は、この方法が、「空気同伴(air-carried)」予備-PCR汚染（例えば、髪、皮膚等から放出されたヒトDNA）に対して比較的低感度なことである。

本発明の方法の効率を、例えばMSPEに対する鑄型の開始時点の量を等しくするための努力によって、改善するために更なる研究が必要である。我々の研究室における最近の実験は、この改善が3-ラウンドのPCRの設定により達成されることを示している。もう一つの改善は、分析前に、例えば野性型の細胞に対して、突然変異体を選択的に精製することによって、該サンプルを変異体に「富むものとする」ことにより達成できた。

1回の分析で幾つかの突然変異についてスクリーニングすることは、同時に多数のミスマッチプライマーを使用することにより可能であった。このような、所

謂「多重-PCR(Multiplex-PCR)」アッセイの付随的な検討は、価値あるものである。最後に、スクリーニングテストにおける本技術の可能性ある用途の更なる評価が必要である。恐らく高い特異性をもつであろう、このようなテストは、大便中の血液の検出の価値を大幅に越える正の予測的な価値を与えるであろう。

最近、Ki-ras突然変異が、膵臓腺癌およびその推定された先駆的病巣をもつ患者の大便中にも同定³⁹された。この発見は、大便中のKi-ras分析の可能な範囲を更に一層拡大する。従って、大便中のKi-rasの検出は、結腸直腸癌の初期検出ばかりか、その他の胃腸管および膵臓の悪性疾患に対しても、迅速かつ非一侵襲的スクリーニング法であり得る。

実施例3：膵臓の悪性病巣の正確な診断におけるKi-ras癌遺伝子分析

コドン12における特異的 point 突然変異による該Ki-ras癌遺伝子の活性化は、膵臓管腺癌において、著しく高頻度で起こり、この癌の病因学における重要な事象であると思われる。Ki-ras癌遺伝子の突然変異はまた、悪性病巣をもつ患者の膵液中にも検出できる。かくして、この特異的な遺伝子一活性化は、膵臓の悪性疾患の診断において、慢性的な膵炎に対する種々の診断において、また膵臓の悪性嚢胞性疾患からの良性部分の分離のために役立ち得る。

我々は、最近0.02という感度限界（1個の突然変異誘発された対立遺伝子をもつ細胞／正常な細胞）をもつKi-ras突然変異の検出および同定に対する迅速かつ非一放射性SSCP-アッセイを開発した。我々は、膵臓の悪性病巣を手術した30名の患者から得た種々のサンプルに対してこの技術を適用した。この30名全ての患者が、該腫瘍におけるコドン12の突然変異を有してした。12名の患者から採取した膵液は、9例における突然変異の存在を示した。元々は非一悪性であると分類された、膵臓の嚢胞性疾患に罹った3名の患者は、シスト液およびシスト壁生検においてKi-ras突然変異を示し、かつ悪性組織学的見解は手術後に確認された。3名の患者から採取された腹水は、該腫瘍中に見出されたものと同様の突然変異の存在を示した。

突然変異gat およびgtt の存在は、あらゆる他の突然変異の存在よりも、手術後の良好な予後と関連しているものと考えられる。我々は、膵臓の病巣における

Ki-ras突然変異についての分析は、診断および予後両者にとって有用であり得、また生存に対する唯一の望みが早期診断および根治的外科手術であるこの破壊的な疾患に対する初期診断に導く可能性がある」と結論付ける。

実施例4：膵臓腺癌における改善された患者生存率と、特異的Ki-ras遺伝子突然変異との関連

膵臓腺癌は、Ki-ras遺伝子突然変異の高い発生率をもつことが知られている。本研究において、ホルマリンで固定し、かつパラフィンに包埋した、初期腺癌に罹患した73名の患者からの腫瘍物質を、一本鎖配座多形性に基づく方法を利用して、Ki-rasエキソン1における活性化点突然変異の存在について調べた。連続的に増幅した68例の癌のうちの49例(72%)が、1または数個の突然変異を含んでいた。

生存率分析は、Ki-ras突然変異の有無と患者の生存率との間の相関を何等示さず、また1または数個の突然変異を有する場合同志の差異も何等観測されなかった。しかしながら、2種の特異的な突然変異(コドン12におけるgtt およびgatトリプレット)の存在は、他の型の全ての突然変異または突然変異の不在($p=0.0038$)と比較して、改善された患者の生存率と有意に関連していた。診断時点における患者の年齢、腫瘍の直径および腫瘍の局在性、更にはKi-ras突然変異の型を包含する、多変数生存率分析(コックス法(Cox' method))は、強力なかつ独立の予後的な重要性($p=0.03$)を示した。

かくして、Ki-rasのエキソン1におけるgtt およびgat 突然変異の存在は、予後が有意に改善された、膵臓腺癌に罹患した患者のサブグループを定義する。Ki-rasの分子的分析は、広範な外科的治療によりより一層の利益が得られると思われる患者を選択するための有用なマーカーであり得る。

参考文献

1. シドランスキー(Sidransky)D. トキノ(Tokino), T., ハミルトン(Hamilton)S R 等、治療可能な結腸直腸腫瘍をもつ患者の大便中のras 癌遺伝子の突然変異の同定、Science, 1992; 256: 102-105。

2. ボス(Bos)JL, フェアロン(Fearon)ER, ハミルトン(Hamilton)SR 等、ヒト結腸直腸癌中のras 遺伝子の突然変異の発生率、Nature, 1987; 327:293-297。
3. フォレストア(Forrester)K, アルモグエラ(Almoguera)C, ハン(Han)K, 等、ヒト結腸腫瘍形成中の、Ki-ras癌遺伝子の高い発生率の検出、Nature, 1987; 327:298-303。
4. ボス(Bos)JL、ヒトの癌における癌遺伝子: A review. Cancer Res., 1989; 49:4682-4689。
5. バーマー(Burner)GC, ラビノビッチ(Ravinovitch)PS, ロープ(Loeb)LA、細胞選別、ポリメラーゼ連鎖反応およびDNA 配列決定による、ヒト結腸癌におけるc-Ki-ras突然変異の分析、Cancer Res., 1989; 49:2141-2146。
6. ボーゲルシュタイン(Vogelstein)B, フェアロン(Fearon)ER, ハミルトン(Hamilton)SR 等、結腸直腸腫瘍発現中の遺伝子変異、N. Eng. J. Med., 1988; 319:525-532。
7. カペラ(Capella)G, クロナウアー-ミトラ(Cronauer-Mitra)S, ペイナド(Peinado)MA, ペルチョ(Perucho)M、ヒト腫瘍におけるc-Ki-ras遺伝子のコドン12および13における突然変異の頻度およびスペクトル、Environ. Health Perspect., 1991; 93:125-131。
8. ブレイビック(Breivik)J, メリング(Meling)GJ, スパークランド(Spurkland)A, ログナム(Rognum)TO, ゴーデルナック(Gaudernack)G、結腸直腸癌におけるKi-ras突然変異: 患者の年齢、性別および腫瘍の位置に対する関係、Br. J. Cancer, 1994; 69:367-371。
9. モエルカーク(Moerkerk)P, アレンズ(Arends)JW, ファンドリエル(van Driel)M, ドウブリン(de Bruine)A, ドウゴージ(de Goeij)A, テンケイト(ten Kate)J、ヒト結腸直腸癌の段階に関連する、Ki-ras点突然変異の型および数、Cancer Res., 1994; 54:3376-3378。
10. デービス(Davis)LG, バッテリー(Battery)J, ディブナー(Dibner)MD、分子生物学における基本的方法、N.Y., エルセビア(Elsevier), 1986:320-323。
11. セップ(Sepp)R, スザボ(Szabo)I, サカモト(Sakamoto)H、PCR で使用するた

めの、ルーチン処理した保管所の組織からのDNA 抽出のための高速技術、J.Clin. Pathology, 1994;47:518-523。

12. テイラー(Taylor)GR、ポリメラーゼ連鎖反応：基本原理および自動化：マックファーソン(McPherson)MJ, カーク(Quirke)P, テイラー(Taylor)GR 編、PCR: 実際の方法、オックスフォード：オックスフォードユニバーシティープレス, 1992:1-14。

13. ロルフス(Rolfs)A, シュラー(Schuller)I, フィンク(Finckh)U, ウェーバー-ロルフス(Weber-Rolfs)I., PCR: 臨床的診断および研究、Berlin, Springer-Verlag, 1992;1-22。

14. マイヤース(Myers)RM, ルメルスキー(Lumelsky)N, ラーマン(Lerman)L, マニアティス(Maniatis)T, 全ゲノムDNA における単一塩基置換の検出、Nature, 1985;313:495-498。

15. ウインター(Winter)B, ヤマモト(Yamamoto)F, アルモグエラ(Almoguera)C, ペルチョ(Perucho)M, 転写遺伝子における点突然変異を検出し、かつ特徴付けする方法：ヒト腫瘍細胞における変異体c-Ki-ras対立遺伝子の増幅および過剰発現、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1985;82:7575-7579。

16. ファーラー・ドゥフリース(Verlaan-de Vries)M, ボガード(Bogaard)ME, ファンデンエルスト(van den Elst)H, フォンブーム(von Boom)JH, ファンデアエブ(van der Eb)AJ, ボス(Bos)JL, 合成オリゴデオキシヌクレオチドを使用した突然変異誘発されたras 癌遺伝子に対するドット・プロットスクリーニング法、Gene, 1986;50:313-320。

17. エーレン(Ehlen)T, デュボー(Dubeau)L, 突然変異-特異的、イノシン-含有オリゴヌクレオチドプライマーを使用した、ポリメラーゼ連鎖反応によるras点突然変異の検出、Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989;160:441-447。

18. スズキ(Suzuki)Y, オリタ(Orita)M, シライシ(Shiraishi)M, ハヤシ(Hayas

hi)K, セキヤ(Sekiya)T, ポリメラーゼ連鎖反応生成物の一本鎖配座多形解析による、ヒト肺癌におけるras 遺伝子突然変異の検出、Oncogene, 1990;5:1037-1043。

19. ロシター(Rossiter)BJF, カスキー(Caskey)CT、突然変異検出の分子走査法、J. Biol. Chem., 1990;265:12753-12756。
20. レビ(Levi)S,ウルバノーイスピツァ(Urbano-Ispizua)A,ギル(Gill)R 等、高感度ポリメラーゼ連鎖反応技術により立証された胆管癌における、多重Ki-rasコドン12突然変異、Cancer Res.,1991;51:3497-3502。
21. ペレガータ(Pellegata)NS, ロセクト(Losekoot)M, フォッデ(Fodde)R等、変性勾配ゲル電気泳動法(DGGE)によるKi-ras突然変異の検出：膵臓癌に関する研究、Anticancer Res., 1992;12:1731-1736。
22. オリタ(Orita)M,スズキ(Suzuki)Y, ハヤシ(Hayashi)K、ポリメラーゼ連鎖反応を利用した、点突然変異および遺伝子多形性の迅速かつ高感度検出、Genomics, 1989;5:874-879。
23. オリタ(Orita)M,イワハナ(Iwahana)H,カマザワ(Kamazawa)K等、一本鎖配座多形性としての、ゲル電気泳動によるヒトDNA の多形の検出、Proc. Natl. Acad. Sci., 1989;86:2766-2770。
24. ハヤシ(Hayashi)K,PCR-SSCP: ゲノムDNA 内の突然変異の簡単かつ高感度検出法、PCR Methods Appl., 1991;1:34-38。
25. ロルフス(Rolfs)A,シュラー(Schuller)I, フィンク(Finckh)U, ウェーバー-ロルフス(Weber-Rolfs)I.,PCR: 臨床的診断および研究(Clinical diagnostics and research), Berlin, Springer-Verlag, 1992;163-167。
26. ウルヴィック(Ulvik)A、ファルマーシアファーストシステム上での、SSCPによるKi-rasのエキソン1内の突然変異の迅速な検出および同定(提示された原稿)。
27. ソマー(Sommer)SS,キャサディー(Cassady)JD, ソベル(Sobel)JL, ボッテマ(Bottema)CDK、点突然変異または多形を検出するための新規方法並びにそのフェニルケトン尿症のキャリアーについての集団スクリーニングへの適用、Mayo Clin. Proc., 1989;64:1361-1372。
28. ウー(Wu)DY, ウゴッツオリ(Ugozzoli)L, パル(Pal)BK, ワラス(Wallace)RB、鎌状赤血球貧血の診断用の、 β -グロビンゲノムDNA の対立遺伝子-特異的増

幅、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1989; 86:2757-2760。

29. ソマー (Sommer)SS, グロツバッハ (Groszbach)AR, ボッテマ (Bottema)CDK、特異的対立遺伝子 (PASA) の PCR 増幅は、既知の単一塩基突然変異を迅速検出するための一般的方法である、Bio Techniques, 1992;12:82-78。

30. ボッテマ (Bottema)CDK, ソマー (Sommer)SS、特異的対立遺伝子の PCR 増幅：既知の突然変異および多形の迅速検出、Mutation Res., 1993;288:93-102。

31. ニュートン (Newton)CR, グラハム (Graham)A, ヘプチンスタル (Heptinstall)LE等、DNA における任意の点突然変異の分析。増幅不応性突然変異系 (ARMS)、Nucleic Acids Res., 1989;17:2503-2516。

32. ポータージョーダン (Porter-Jordan)K, ローゼンバーグ (Rosenberg)EI, カイザー (Keiser)JF 等、サイトメガロウイルスの検出用の入れ子式ポリメラーゼ連鎖反応アッセイは、フラグメント化 DNA での汚染により引き起こされる正の誤差を回避する。J. Med. Virol., 1990;30:85-91。

33. シモンズ (Simmonds)P, バルフェ (Balfe)P, プーセラー (Peutherer)JF, ルドラム (Ludlam)CA, ビショップ (Bishop)JO, ブラウン (Brown)AJL、ヒト免疫不全ウイルス-感染個体は、少ない数で、幾つかの末梢単核細胞内にプロウイルスを含有する。J. Virol., 1990;64:864-872。

34. ポータージョーダン (Porter-Jordan)K, ギャレット (Garrett)CT、ポリメラーゼ連鎖反応アッセイにおける汚染源、Lancet, 1990;19:335。

35. ダキラ (D'Aquila)RT, ベクテル (Bechtel)LJ, ビドラー (Videler)JA, エロン (Eron)JJ, ゴルツィカ (Gorzyca)P, カプラン (Kaplan)JC、増幅前加熱による PCR の感度および特異性の極大化、Nucleic Acids Res., 1991;19:3749。

36. チュー (Chou)Q, ラッセル (Russell)M, ビルヒ (Birch)DE, レイモンド (Raymond)J, ブロッホ (Bloch)W、予備-PCR二量化の防止は、低コピー数増幅を改善する。Nucleic Acids Res., 1992;20:1717-1723。

37. デュークス (Dukes)CE、直腸の癌の分類、J. Pathol. Bacteriol., 1932;35:323-332。

38. ランプ (Lampe)JW, フレッドストローム (Fredstrom)SB, スラビン (Slavin)JL

,ポッター (Potter)JD、結腸機能の性別による差異：ランダム化法、Gut., 1993; 34:531-536。

39. カルダス (Caldas)C, ハーン (Hahn)SA, ルーバン (Hruban)RH, レッドストーン (Redston)MS, イエオ (Yeo)CJ, カーン (Kern)SE、膵臓腺癌および膵管過形成に罹った患者の大便中のKi-ras突然変異の検出、Cancer Res., 1994;54:3568-3573。

40. ハヤシ (Hayashi)K、Genet. Anal. Tech. Appl., 1992;9:73-79。

41. タカハシーフジイ (Takahashi-Fujii), イシノ (Ishino)A, シマダ (Shimada)A 及びカトウ (Kato)I、PCR Methods Appl., 1993;2:323-327。

42. トランパー (Trumper)LH, バーガー (Burger)B, フォンボニン (von-Bonin)F, ヒンツェ (Hintze)A, フォンブローン (von-Blohn)G, フロインズシュー (Pfreundschuh)M, 及びダウス (Daus)H、J. Cancer, 1994;80:278-284。

【図1】



Fig 1

【図2】

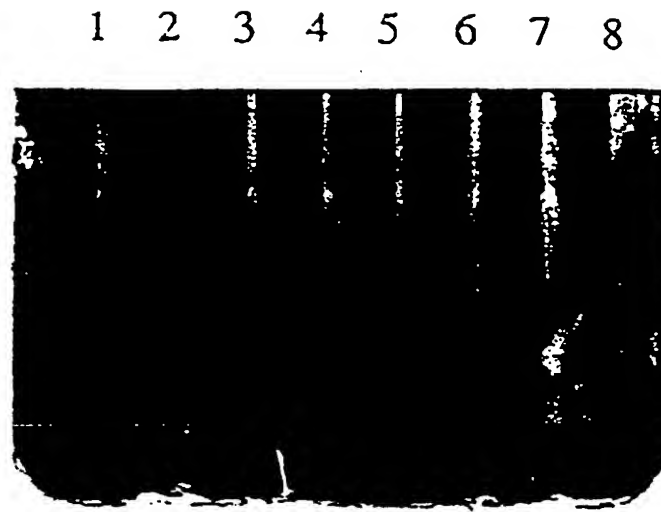


Fig 2

【図3】

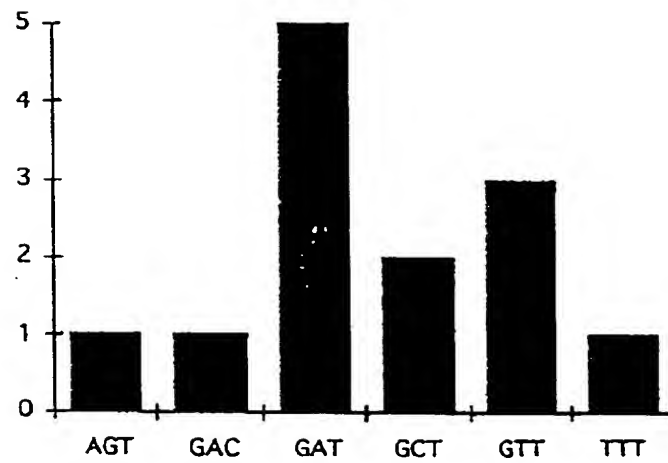


Fig 3

BEST AVAILABLE COPY

【図4】

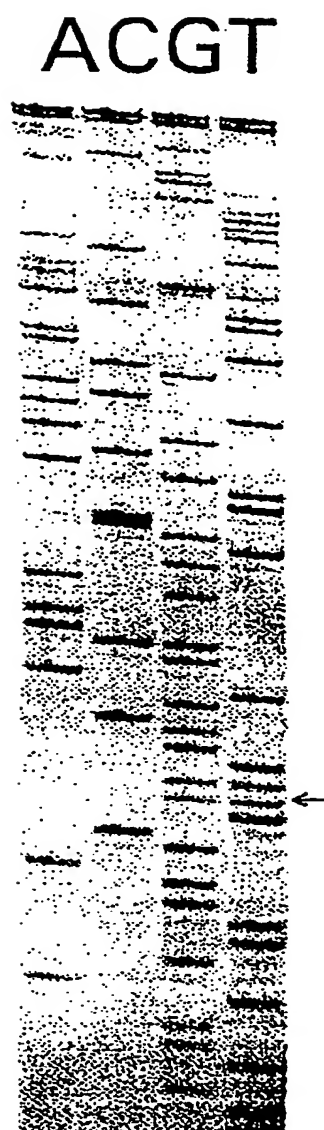


Fig 4

BEST AVAILABLE COPY

【図5】

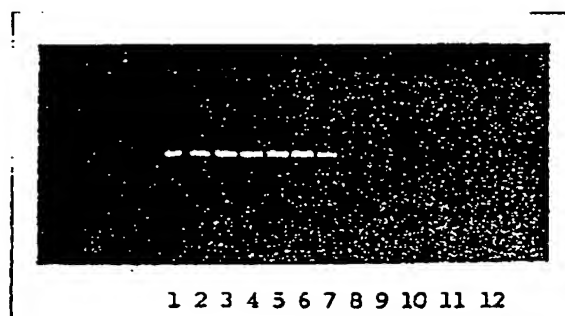


Fig 5

BEST AVAILABLE COPY

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1997年11月13日(1997. 11. 13)

【補正内容】

補正書の翻訳文

1. 明細書の翻訳文第3頁第10行目～第4頁第10行目を以下の通り補正する。
。「大便由来のDNAのPCR増幅も、スミスーラビン(Smith-Ravin)等(Gut, 1995, 35, pp.81-86)により公知である。この手順では、10-50gの大便を使用し、かつDNAを抽出し、次いで精製されたDNAを、ミトコンドリアプライマーを使用して増幅し、対立遺伝子特異的ミスマッチ法を利用してras突然変異について解析した。全検出率は22のうち9であり、この方法は大量の大便を使用し、かつスクリーニングには不適當であった。というのは、特定の変異対立遺伝子特異的増幅(MASA)プローブを、該突然変異の検出のために使用する必要があったからである。

ハセガワ(Hasegawa)等は、文献Oncogene, 1995, 10, pp.1441-45において、19名中15名の患者由来のDNAを、標準的なMASA技術を利用して増幅し、3種の突然変異を同定した。これに従って、特定のMASA-技術を実施し、結果として10名の患者中に突然変異が検出された。この手順に関わる問題は、低い検出率および各突然変異に対して特異的プローブを使用する必要がある点にある。従って、この方法はスクリーニング分析には不適當である。

スズキ(Suzuki), Y. 等(Oncogene, 1990, 5(7):1037-43)は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)生成物の一本鎖配座多形(SSCP)解析によって、ヒト肺癌におけるras癌遺伝子突然変異の検出を記載している。しかしながら、この方法は該突然変異の配列を示さなかった。

本発明の目的は、十分な特異性と、実施の簡略さとをもち、少量の基質を使用した、組織および大便中のKi-ras突然変異の検出用のスクリーニング手順を提供することにある。

これらの目的は、本明細書に添付された請求の範囲によって特徴付けられる本発明によって達成される。

本発明は、組織または大便の少量サンプル中の、Ki-ras突然変異を検出するた

めのスクリーニング手順に関連し、該手順においては、本発明による特異的なプライマーを使用して、221塩基対をもつPCR生成物を生成する。この生成物は、固有の一本鎖配座多形(SSCP)パターンを示す。該パターンにおいては、各突然変

異を、20%の均一なポリアクリルアミドゲル(ファーストゲル(Phast-gels)、ファルマーシア(Pharmacia)社)上で実施したSSCP解析を利用して、検出し、かつ同定する。

該PCR生成物の量を増大するために、引き続き半入れ子式(semi-nested)PCRを実施することができ、該PCR法では、5'末端において余分のオリゴヌクレオチドを使用し、一方で3'末端で、該第一段階の特異的なオリゴプライマーを使用した。次のPCRサイクルにおいて、該第一段階からの両オリゴプライマーを使用した。結果として、該221塩基対をもつPCR生成物を得た。この生成物において、該突然変異はファーストゲルSSCPを使用して、上記のように検出した。」

2. 請求の範囲を以下の通り補正する。

「1. 2つの連続するPCR増幅により、組織、腫瘍組織、組織分泌物、排泄物、喀出物のサンプル中の、エキソン1中の、コドン12~13のKi-ras突然変異を検出する方法であって、正規のPCR増幅と対立遺伝子特異的増幅とを含み、該同定段階が、ファーストゲルSSCPを含む検出方法において、該2つのPCR増幅と該ファーストゲル同定との組み合わせ、または該正規のPCR増幅とファーストゲル同定との組み合わせにおける、生成されたオリゴプライマーの特異的選択によって、該突然変異の直接的検出が該ゲル上でのバンドとしてもたらされることを特徴とする、上記Ki-ras突然変異の検出方法。

2. DNAを精製し、かつ分離した後、該突然変異に対する特異的フランキングオリゴプライマーを使用し、該DNAの5'末端における付随的な特異的オリゴヌクレオチドと共に、上記のフランキングオリゴプライマーの使用を組み合わせまたは組み合わせずに(半入れ子式PCR)、少なくとも2つのミスマッチをもつプローブを使用する第三の段階と組み合わせまたは組み合わせずに、該突然変異を含む特異的PCR生成物を生成し、かつ適当な方法によって該突然変異体を同定する、請

求の範囲第1項に記載の方法。

3. 該サンプルを結腸、直腸、肺および膵臓から採取する、請求の範囲第1～2項に記載の方法。

4. 該方法で使用する該サンプルが、新鮮なおよび／または凍結されたおよび／またはパラフィンに包埋されたものである、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

5. 該サンプルが、分泌物、排泄物、喀出物中に堆積した細胞を表す、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

6. 該サンプルが、大便、膵液、膵臓由来の嚢胞性流体、結腸および直腸由来の生検検体を含む、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

7. 該第三段階における該ミスマッチプローブが、3'末端に少なくとも一つのミスマッチを、および該3'末端から2または3塩基の位置に一つの付随的なミスマッチを有する、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

8. 該生成された特異的PCR生成物が221塩基対を有する、上記請求の範囲の何

れか1項に記載の方法。

9. 該特異的オリゴプライマーを、Ki-ras中のエキソン1の各フランキング領域における、15-28塩基とハイブリッド化する、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

10. 段階1の上流側および下流側フランキングオリゴプライマーが、それぞれ5'-AAG CCT ATG TGT GAC ATG TTC TAA T-3'(R1)(Seq. id. no.5)および5'-AAT GGT CCT GCA CCA GTA AT-3'(R2)(Seq. id. no.2)である、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

11. 段階2の付随的なオリゴプライマーが5'-GGT GGA GTA TTA ACC TTA TGT-3'(R3)(Seq. id. no.11)上流であり、一方で請求の範囲第11項に記載のR2(Seq. id. no.2)を、該下流側オリゴプライマーとして使用した、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

12. 該段階3の突然変異特異的ミスマッチプライマーが、GCT:5'-AAG GCA CTC T TG CCT ACG CTA G-3'(R4)(Seq. id. no.11); GTT:5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG

CTA A-3'(R5)(Seq. id. no.6); GAT:5'-AAG GCA CTC TTG CCT ACG CTA T-3'(R6)(Seq. id. no.7); GAC:5'-CGT CAA GGC ACT CCT GCC TAC CT-3'(R7)(Seq. id. no.8); AGT:5'-AGG CAC TCT TGC CTA CGC TAT T-3'(R8)(Seq. id. no.9); TGT: 5'-GCA CTC TTG CCT ACG CCA TA-3'(R9)(Seq. id. no.10)である、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

13. 該同定段階を、適当なゲルを使用して実施する、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

14. 該同定段階を、予備注型ポリアクリルアミドミニゲル（ファーストゲル）上で実施する、請求の範囲第14項に記載の方法。

15. 該方法で出発物質として使用する大便の量が、5-100 mg、好ましくは10mgである、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

16. 該方法で出発物質として使用する腫瘍組織の量が、2-50mg、好ましくは25mgである、上記請求の範囲の何れか1項に記載の方法。

17. 請求の範囲第1項に記載の方法を実施するためのキットであって、該キットが該PCR 反応を実施するための化学物質、オリゴプライマー、適当なゲルおよび

該PCR 生成物を分析するための検出系を含むことを特徴とする、上記キット。」

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NO 96/00271

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC6: C12Q 1/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC6: C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI, FULLTEXT, MEDLINE, GENBANK/EMBL/SWISSPROT/DBJ, CA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9322456 A1 (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE), 11 November 1993 (11.11.93), page 16, line 23, page 17, line 7, table 2, claims <i>e ① w 2-j-15</i>	1-17
A	Dialog Information Services, file 154, MEDLINE, Dialog accession no. 07419402, Medline accession no. 90326402, Suzuki Y et al: "Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single- -strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products"; & Oncogene (ENGLAND) Jul 1990, 5 (7) p1037-43 -----	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 February 1997		28-02-1997
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Patrick Andersson Telephone No. +46 8 782 25 00

03/02/97

PCT/NO 96/00271

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A1- 9322456	11/11/93	CA-A- 2134552	11/11/93
		EP-A- 0655090	31/05/95
		US-A- 5496699	05/03/96

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 ウルヴィク アルネ

ノールウェー国 エヌ-5037 ソルヘイム
スヴィク ファブリックグト 12

(72)発明者 クールンストラ ヤン ヤコブ

オランダ国 エヌエル-7511 エルエム
エンスヘデ ティイホフブルグ 20